

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA

JOÃO CARLOS DIEGUES

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL,
ASPECTOS ENDÓCRINOS E
METABÓLICOS DE RATOS DIABÉTICOS

Santos

2012

JOÃO CARLOS DIEGUES

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL,
ASPECTOS ENDÓCRINOS E
METABÓLICOS DE RATOS DIABÉTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos curriculares para obtenção do título de bacharel em Educação Física – Modalidade Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Gomes

Santos

2012

JOÃO CARLOS DIEGUES

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO
SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL,
ASPECTOS ENDÓCRINOS E
METABÓLICOS DE RATOS DIABÉTICOS

Este exemplar corresponde à redação final do
Trabalho de Conclusão de Curso defendido por João Car-
los Diegues e aprovado pela Banca Examinadora em
18 / 02 / 2013.

Orientador:

Ricardo José Gomes

Santos

2012

Banca examinadora



Ricardo José Gomes
Orientador



Alessandra Medeiros



Camila Aparecida Machado de Oliveira

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais, Antônio e Maria Helena, que durante minha graduação me ajudaram, preparados sempre para me dar total apoio financeiro, psicológico e emocional.

Dedico especialmente a minha tia Chica, principal responsável por eu ter escolhido esta área de estudo que é a Educação Física.

Agradecimentos

Primeiramente, aos meus pais e familiares, que me apoiaram, incentivaram e deram total suporte para que chegasse ao final do curso de Bacharelado em Educação Física.

Ao meu orientador, Ricardo José Gomes, que me apresentou a pesquisa científica e teve grande participação durante minha graduação. Seu apoio durante os meses que tive problemas de saúde foi de imensa importância, sempre me apoiando e incentivando.

A todos os professores que contribuíram de maneira direta e indireta na minha formação acadêmica e me fizeram ver o mundo de maneira diferente após esses quatro anos de curso.

Aos meus colegas e amigos de formação que também me apoiaram. Auxiliaram-me nos estudos, mas também no desenvolvimento de companheirismo e a conquista de grandes amizades.

Ao grupo de pesquisa da UNESP – Rio Claro que me ajudaram com os testes e avaliações presentes neste estudo, e que cuja ajuda foi indispensável para que este projeto fosse finalizado.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Por fim, a todos que estiveram presentes durante minha formação e me ajudaram a realizar este sonho de me tornar um Educador Físico.

“Vai ficar ou vai correr?
 Vai Salvar ou esquecer?
 Eu só quero que me ame até o pôr do sol

Os dias passam, passam as horas
 Tocando temas com um piano desafinado
 Mais ou menos errado, mais ou menos parado
 Sem sentido, um pouco ignorado
 Gritos ecoam, selam memórias, marcam
 Deus ainda chora, sempre rimos e o mundo esquece
 O tempo da última prece
 E ninguém aquece, ninguém acontece
 Você sente na pele
 Os dias estão frios, as noites estão quentes
 Caminham num labirinto de vento
 Vestindo pouco a pouco o esquecimento
 Somos o que fazemos para mudar o que fomos
 Mas se nada somos, virão apenas velhos outonos

Vai ficar ou vai correr?
 Vai Salvar ou esquecer?
 Eu só quero que me ame até o pôr do sol

Uma lágrima no chão reagiu minha lentidão
 Tocou meu coração, fiz o que precisava
 Ele chorava e eu perguntava
 É comida? É uma casa?
 Mal a noite caia, ele dizia
 "Se quiser fazer algo por mim
 Faça um verso sereno
 E que ele me leve
 Não somente até o céu, mas perto das estrelas"
 Somos o que fazemos para mudar o que fomos

Vai ficar ou vai correr?
 Vai Salvar ou esquecer?
 Eu só quero que me ame até o pôr do sol

*Take care about tomorrow
 Do you need someone to follow?
 Yeah, there's a happy end
 Even at the end*

*I can trust you, I can see
 I can try, I can feel it
 Cause tomorrow will be better
 We must believe it"*

Velhos Outonos – Rosa de Saron

Resumo

Sabe-se que o Diabetes tipo I causa inúmeras alterações fisiológicas, incluindo complicações cognitivas. Também já foi comprovado que o exercício físico é capaz de reverter tais complicações. Entretanto pouco é sabido sobre os meios em que o exercício físico é capaz de melhorar aspectos cognitivos. Este projeto tem como objetivo avaliar as alterações endócrinas, metabólicas e memória espacial de ratos com Diabetes tipo I e os efeitos do treinamento físico moderado sobre estas alterações. **Metodologia:** A indução de diabetes foi através da droga aloxana (32 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. Os animais foram divididos em 4 grupos (controle sedentário, controle treinado, diabético sedentário e diabético treinado). O treinamento físico consistiu de 60 minutos diários de natação, cinco dias por semana, durante seis semanas consecutivas, suportando uma sobrecarga equivalente a 90% da transição metabólica individual (identificada em teste de esforço). **Resultados:** O diabetes interferiu negativamente sobre a glicemia, GH, IGF-1 e memória espacial. Entretanto o exercício físico foi capaz de melhorar, mesmo que parcialmente, estes parâmetros (exceto o GH). **Conclusão:** o treinamento reduziu a glicemia, elevou o IGF-1 e o tempo de retenção do teste de memória espacial e reduziu a perda de peso dos animais diabéticos.

Palavras chave: Treinamento aeróbio; Diabetes tipo I; Insulina; IGF-1; GH; Memória espacial.

Abstract

It's known that Diabetes Type I causes a series of physiological alterations, including cognitive complications. It's also proven the capacity of physical exercise on reverting these complications. However little is known about the ways in which the physical training is capable of improving cognitive aspects. This project aims at evaluating the endocrinal, metabolic changes as well as changes in spatial memory of rats with Diabetes Type I and the effects of moderated physical training on these alterations.

Methods: Diabetes was induced by aloxan drug (32 m-kg of body weight) diluted in citrate buffer (0,01 M,pH 4.5) The animals were divided in 4 groups(sedentary control, trained control, sedentary diabetic and trained diabetic group. The physical training was done during 60 minutes swimming daily, five days per week during six consecutive weeks, enduring an overcharge equivalent to 90 percent of the individual metabolic transition (identified in effort test).

Results: Diabetes has interfered negatively on blood glucose, Growth Hormone (GH), Insulin-like Growth Factor-1(IGF-1) and spatial memory. However the physical training was able to improve, while partially, these parameters (with exception of GH)

Conclusion: Physical training reduced blood glucose, raised IGF-1 and the period of retention of spatial memory test, reducing also the weight loss of the diabetic animals.

Key words: Aerobic training, Diabetes type I, Insulin, IGF-1, GH, Spatial memory.

Sumário

1 – Introdução	11
2 – Métodos	15
2.1 – Amostragem	15
2.2 – Indução do Diabetes e divisão dos grupos	15
2.3 – Treinamento	15
2.4 – Avaliações pré-eutanásia	16
2.5 – Avaliações pós-eutanásia	17
2.6 – Análise estatística	19
3 – Resultados	20
4 - Discussão	30
5 - Conclusão	35
6 – Referências bibliográficas	36
Anexo A	40

1 - INTRODUÇÃO

O Diabetes tipo I é uma doença crônica, que se manifesta por volta da puberdade e é caracterizada pela ausência das células- β do pâncreas (destruídas em processo auto-imune), responsáveis pela produção do hormônio insulina. A ausência de insulina está relacionada a várias complicações fisiológicas, incluindo: hiperglicemia, neuropatia periférica, lesões nos olhos, rins, coração e vasos sanguíneos (GUYTON e HALL, 1996). Ultimamente estudos vêm mostrando a importância da sinalização de insulina no sistema nervoso central, e que a deficiência desta está correlacionada a prejuízos cognitivos (WOODS *et al.*, 2000; BRUNING *et al.*, 2000; MOLONEY *et al.*, 2010; Li *et al.* 2007; You *et al.* 2009)

Então, este projeto busca compreender o problema: O exercício físico tem efeito na memória espacial e fatores de crescimento de ratos Wistar com Diabetes tipo I? E qual a importância deste efeito?

A insulina é um hormônio, secretado pelas células- β do pâncreas, e é fundamental para o funcionamento do organismo. Sua principal ação é o anabolismo, ou seja, a captação de substratos energéticos pelos tecidos, por exemplo: aumentar a velocidade de captação de glicose pelos tecidos periféricos, aumentar a captação de aminoácidos e estimular a síntese proteica e estimular a captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo. No Diabetes tipo I há um estado de hiperglicemia crônica, resultante da escassez do hormônio insulina, produzindo em longo prazo disfunções e deficiências em vários órgãos, tecidos e sistemas (GUYTON e HALL, 1996).

Estudos têm mostrado uma ação relevante da insulina no sistema nervoso central (WOODS *et al.*, 2000; BRUNING *et al.*, 2000). Pesquisas vêm apontando a insulina como neuromodulador em diferentes regiões do sistema nervoso central, agindo por meio de receptores específicos (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Este hormônio modula, também, neurotransmissores fundamentais para a cognição, tais como acetilcolina, noraepinefrina e dopamina (BINGHAM *et al.*, 2002).

O Fator Semelhante a Insulina (IGF) é um peptídeo encontrado nas formas de IGF-1 e IGF-2. São sintetizados pelo fígado e por diversos outros tecidos em resposta ao Hormônio do Crescimento (GH) ou de forma independente deste hormônio (HORST *et al.*, 2002). Acredita-se que o IGF-2 desempenhe maior papel no desenvolvimento

fetal, enquanto o IGF-1 parece ser fundamental para o desenvolvimento pós-natal somático, aumentando a captação de aminoácido e glicose pelos tecidos periféricos (COOPER, 1994; BUTLER e LeROITH, 2001). Os IGFs encontram-se ligados à proteínas transportadoras denominadas IGFBPs (IGFs binding proteins), que foram classificadas em 6 tipos e numeradas de 1 a 6 (IGFBP-1 à IGFBP-6, sequencialmente), sendo a IGFBP-3 a mais abundante no soro humano, transportando mais de 80% do IGF-1 do sangue (JONES & CLEMMONS, 1995).

Em estudos anteriores, foi observado que há uma redução das concentrações séricas e teciduais de IGF-1 em ratos aloxânicos (diabéticos, induzido por aloxana), e que o treinamento em meio aquático recupera ou ameniza essas alterações (GOMES *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2009). Foi observado também que os níveis cerebelares de IGF-1 em ratos diabéticos aloxânicos encontram-se reduzidos e o exercício físico amenizou tais alterações. Foi demonstrado que a sinalização de receptores de IGF-1 e de insulina é alterada em neurônios de organismos com doença de Alzheimer (MOLONEY *et al.*, 2010). Li *et al.* (2007) observaram um aumento significativo da Proteína Precursora de β -amilóide (proteína que quando aumentada favorece a formação de placas senis) no hipocampo de ratos diabéticos.

O hipocampo é a estrutura do Sistema Nervoso Central envolvida com o conhecimento e reconhecimento de lugares, pessoas, fatos e acontecimentos, ligando estes a seus significados. Essas recordações fazem parte de um tipo específico de memória chamada declarativa, que ainda pode ser dividida em dois tipos, semântica e episódica (SHARMA *et al.*, 2010). Segundo os mesmo autores, a memória espacial é considerada um tipo de memória episódica, e segundo Astur *et al* (2002) pode ser prejudicada por lesões no hipocampo.

Roriz-Filho *et al* (2009) e Wessels *et al* (2008) afirmam que a hiperglicemia crônica prejudica o metabolismo e perfusão cerebral através de danos celulares e vasculares, gerando déficits cognitivos modestos, mas que podem se tornar graves.

Em estudos recentes vem sido evidenciado que o exercício físico regular pode prevenir distúrbios cognitivos associados à senilidade (PRAAG *et al.*, 2005; ALAEI *et al.*, 2007). Nestes trabalhos, os animais (ratos e camundongos) foram submetidos a um protocolo de treinamento físico e os grupos treinados apresentaram melhoras significativas em parâmetros relacionados a cognição em comparação aos grupos sedentários.

Entretanto os mecanismos exatos pelos quais o exercício físico previne o declínio da memória não foram bem estabelecidos.

Tem sido demonstrado que o exercício físico tem a capacidade de aumentar a expressão do receptor de insulina no hipocampo (PARK *et al.*, 2000). Outro dado pertinente é que o exercício físico pode aumentar as concentrações séricas e teciduais de IGF-1 em organismos saudáveis, além de recuperar os níveis séricos desse peptídeo em animais diabéticos (GOMES *et al.*, 2006).

You *et al.* (2009) demonstraram que o treinamento físico em esteira recuperou a memória espacial de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). Reisi *et al.* (2010) demonstraram que diabetes induzido por STZ prejudica a função hipocampal de ratos e que o treinamento em esteira recupera a memória espacial desses animais. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais o treinamento físico previne ou retarda o desenvolvimento de distúrbios cognitivos não foram ainda bem estabelecidos, sobretudo em animais diabéticos aloxânicos. Portanto, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos do treinamento físico aeróbio de natação com intensidade controlada sobre o eixo GH/IGF-1, bem como sobre aspectos relacionados a memória de ratos diabéticos. Este trabalho busca também verificar se o comportamento do eixo GH/IGF-1 durante seis semanas de treinamento aeróbio a 90% da transição metabólica (teste do lactato mínimo) é semelhante aquele observado em estudos anteriores que utilizaram oito semanas de treinamento com carga de 90% da máxima fase estável de lactato.

Diante do exposto o objetivo geral desse estudo foi investigar os efeitos de seis semanas de treinamento físico moderado sobre a memória espacial, bem como as concentrações séricas dos hormônios IGF-1 e GH em organismos diabéticos.

Os objetivos específicos deste estudo incluíram:

Avaliar a evolução da massa corporal;

Avaliar a memória espacial dos animais;

Acompanhar o consumo hídrico e alimentar;

Determinar a carga equivalente à transição metabólica pelo teste do lactato mínimo

Avaliar o Hematócrito dos animais;

Avaliar a glicemia dos grupos estudados;

Avaliar a concentração sérica de Insulina;

Avaliar Concentração sérica de IGF-1;

Avaliar concentração sérica de GH;

Expressão proteica do receptor de insulina IR- β beta no hipocampo

A hipótese deste estudo é que o diabetes prejudicará aspectos endócrino-metabólicos e a memória de ratos. Espera-se que a partir dos resultados encontrados seja possível confirmar a importância do exercício físico regular sobre a memória, bem como sobre o controle endócrino-metabólico de ratos diabéticos.

2 – MÉTODOS

2.1 - Amostragem

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, Nº 2012/00217.

Para este projeto foram utilizados inicialmente cerca de 50 ratos adultos da linhagem Wistar que ficaram em gaiolas coletivas, temperatura de $25 \pm 1^\circ$ e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e alimento. Todos os animais tiveram a ingestão hídrica e alimentar e peso corporal registrados uma vez por semana ao longo do experimento.

2.2 – Indução do Diabetes e Divisão dos grupos

A indução do *Diabetes Mellitus* tipo I foi feita pela droga aloxana. Primeiro foram anestesiados com éter etílico e em seguida receberam aloxana monoidratada Sigma (32 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. Cinco dias após, foi realizado um teste de glicemia para comprovação do estado diabético dos animais, sendo considerados diabéticos os que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg por 100 ml de sangue.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos: Controle Sedentário, ratos controles que não realizaram exercícios físicos; Controle Treinado, ratos controles que foram submetidos ao protocolo de exercícios físicos; Diabéticos Sedentários, ratos aloxânicos que não realizaram exercícios físicos; Diabéticos Treinados, ratos aloxânicos que foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento que o grupo Controle Treinado.

2.3 - Treinamento

Os animais foram adaptados ao meio líquido e submetidos ao teste de lactato mínimo para identificação da intensidade de transição metabólica (TM). A TM equivale

a maior concentração de lactato sanguíneo produzido durante o exercício no qual sua presença na circulação é compensada pela remoção durante o exercício de cargas constantes. Para realização do teste de lactato mínimo, os animais foram colocados em um tanque com água usando um colete com 50% de seu peso corporal. Para manterem-se acima da linha da água, realizaram saltos (exercício anaeróbio) por seis minutos, intervalados entre 30 segundos de exercício e 30 segundos de repouso, resultando na elevação da concentração de lactato sanguíneo. Após o exercício com 50% do peso, os ratos repousaram por nove minutos. Após o repouso, iniciaram o protocolo de natação de cargas crescentes (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0% de peso corporal), nadando cinco minutos com cada carga. Durante o repouso e nos momentos de troca de cargas, amostras de sangue foram coletadas da extremidade distal da cauda de cada animal para a determinação do lactato (VOLTARELLI *et al.*, 2005)

Após a determinação intensidade de transição metabólica, foi iniciado o protocolo de treinamento que consistiu de natação por 60 minutos diários, cinco dias por semana, durante seis semanas consecutivas, suportando sobrecarga equivalente a 90% da transição metabólica. As sessões de natação foram realizadas em recipiente de amianto com 100 cm de comprimento, 70 cm de largura e 60 cm de altura. Os recipientes tinham água numa profundidade de 40 cm, de tal forma que os animais não pudessem apoiar a cauda no fundo do tanque e com temperatura da água mantida em $31 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.4 – Testes pré-eutanásia

Na última semana de experimento os animais foram submetidos ao teste agudo de natação de 20 minutos com coleta de sangue para dosagem de lactato a cada cinco minutos. Os animais dos quatro grupos experimentais (CS, CT, DS e DT) foram submetidos a um teste, no qual nadaram por 20 minutos nos mesmos tanques e sob as mesmas condições do protocolo de treinamento que vinha sendo executado pelos grupos CT e DT. Contudo, o tempo foi limitado em 20 minutos pela possibilidade de morte dos animais sedentários (CS e DS) durante o teste. Na ocasião, amostras de sangue foram coletadas aos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, para avaliação das concentrações de lactato, com o objetivo de confirmar a eficácia do protocolo de treinamento empregado. O lactato foi avaliado pelo método do fluoreto de sódio a 1%, com leitura em lactímetro eletroquímico modelo YSI 2300 Stat.

Para o teste de memória, foi utilizado o teste do labirinto aquático de Morris, um dos testes mais empregados para avaliação da memória espacial. Outro dado relevante é que a adaptação dos animais sedentários ao meio líquido também minimiza o favorecimento dos animais treinados ao labirinto aquático de Morris. Além disso, por se tratarem de locais muito distintos (tanque de treinamento físico e o labirinto aquático de Morris), os animais treinados não são favorecidos no labirinto aquático. O local de treinamento de natação é uma caixa retangular com água numa profundidade de 40cm, enquanto o labirinto de Morris é uma piscina circular com 1,30 metros de diâmetro e com 70 cm de profundidade. A água do tanque foi misturada com leite desnatado para que ficasse opaca e os animais não fossem capazes de localizar a plataforma visualmente (MORRIS *et al.*, 1981).

Os animais foram colocados no labirinto durante quatro dias e o tempo despendido (tempo de latência em segundos) para encontrar a plataforma foi registrado a cada tentativa. Os ratos foram colocados na água no quadrante apostado ao da plataforma, sempre no mesmo ponto. Após encontrarem a plataforma, os animais permaneceram sobre a mesma por 30 segundos. No quinto dia foi realizado o teste de retenção, em que a plataforma foi retirada e os animais colocados no quadrante oposto de onde ela deveria estar. O tempo de retenção (marcado em segundos) consistiu em quanto os animais permaneceram dentro do quadrante em que a plataforma estava anteriormente.

2.5 – Testes pós-eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por decaptação, seguida da retirada dos tecidos listados abaixo.

Em relação às avaliações biológicas, a glicemia foi avaliada pelo método colorimétrico da glicose oxidada. A Insulina sérica foi determinada pelo método imunoenzimático (ELISA) Kit comercial. O GH sérico foi determinado pelo método imunoenzimático (ELISA) Kit comercial. O IGF-1 sérico foi determinado pelo método imunoenzimático (ELISA) por kit comercial. Para avaliar a ocorrência de desidratação, foi mensurado também o Hematócrito, obtido em centrífuga de micro-hematócrito.

A expressão de Receptor de insulina beta (IR β) foi determinada pelo método Western Blot, descrito a seguir:

Extração do tecido : Após a eutanásia, foram retirados fragmentos (3,0 x 3,0 mm) do hipocampo que foram imediatamente homogeneizados em tampão específico contendo 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C, usando um polytron (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em máxima velocidade por 30 s. Em todas as amostras foi adicionado triton X-100 1% e as mesmas permaneceram no gelo por 40 minutos. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 40 minutos em centrífuga “Eppendorf” refrigerada. O “pellet” foi desprezado e amostras do sobrenadante serão usadas para medida da concentração protéica, utilizando-se o reagente para o ensaio Bio-Rad Protein Assay-Dye Reagent Concentrate (Melville, NY). foi utilizado como referencial, uma curva-padrão de albumina.

Imunoblot: Após determinação da concentração das proteínas, os imunocomplexos foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100mmol/L de DTT. Após rápida fervura, foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpo específico (Anti-Irβ). A ligação de anticorpo com proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/L de Tris; 150mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5h. O sinal foi detectado por tratamento com 2μCi de [125I] Proteína A (30μCi/μg) em 10 mL de tampão de bloqueio por 2h em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak à -80°C de 12-48h. As bandas identificadas através da auto-radiografia foram quantificadas utilizando-se a densitometria óptica pelo programa Scion Image Software (ScionCorp, Frederick, MD).

As análises acima foram realizadas com os animais de cada grupo 48 horas após a última sessão de treinamento físico para excluir os efeitos do exercício agudo.

2.6 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) *two way*, com aplicação do teste “*post-hoc*” de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

3 - RESULTADOS

Tabela 1: Evolução do peso corporal (g) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) com n=14. p<0,05: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Grupos	Semana1	Semana2	Semana3	Semana4	Semana5	Semana6
Peso corporal (g)	CS	263 \pm 25	303 \pm 41	324 \pm 53	352 \pm 29	363 \pm 69	379 \pm 55
	CT	256 \pm 32	279 \pm 30	296 \pm 55	316 \pm 33	333 \pm 57	343 \pm 43
	DS	268 \pm 38	269 \pm 33	274 \pm 47	280 \pm 61a	275 \pm 65	277 \pm 49a,b
	DT	244 \pm 29	293 \pm 30	301 \pm 56	309 \pm 54	316 \pm 58	327 \pm 54

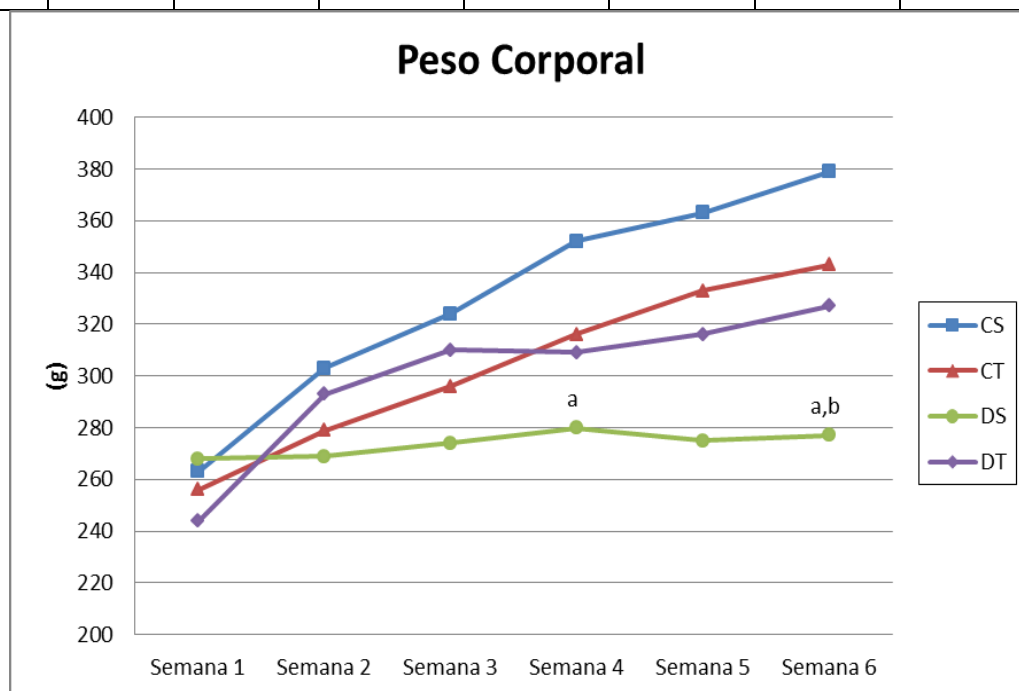


Figura 1: Evolução do peso corporal (g) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). p<0,05: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

A tabela 1 e figura 1 representam a evolução do peso corporal (g) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e

diabético treinado (DT). É possível notar uma diferença significativa nos valores do grupo DS a partir da 4ª semana em comparação aos grupos CS (4ª e 5ª semana) e CT (6ª semana).

Tabela 2: Percentagem de ganho de peso dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). N=14.

Parâmetro	Grupos	Diferença entre semana 1 e 6
% de ganho de peso	CS	44,1%
	CT	33,9%
	DS	3,3%
	DT	34%

Na tabela 2 é possível identificar um ganho percentual de peso superior dos animais dos grupos controle sedentário, controle treinado e diabético treinado em comparação com o grupo diabético sedentário.

Tabela 3: Ingestão alimentar (g/kg p.c.) e ingestão hídrica (ml/kg p.c.) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) com n=14. Não há média padrão, pois as pesagens foram realizadas por gaiola.

Parâmetros	Grupos	Semana1	Semana2	Semana3	Semana4	Semana5	Semana6
Ingestão alimentar (g/kg p.c.)	CS	111	90	96	71	78	83
	CT	112	79	87	84	79	90
	DS	144	151	156	138	160	161
	DT	152	93	105	104	101	111
Ingestão hídrica (ml/kg p.c.)	CS	142	160	163	155	132	115
	CT	170	174	148	156	126	142
	DS	552	539	378	349	403	378
	DT	551	378	296	245	216	270

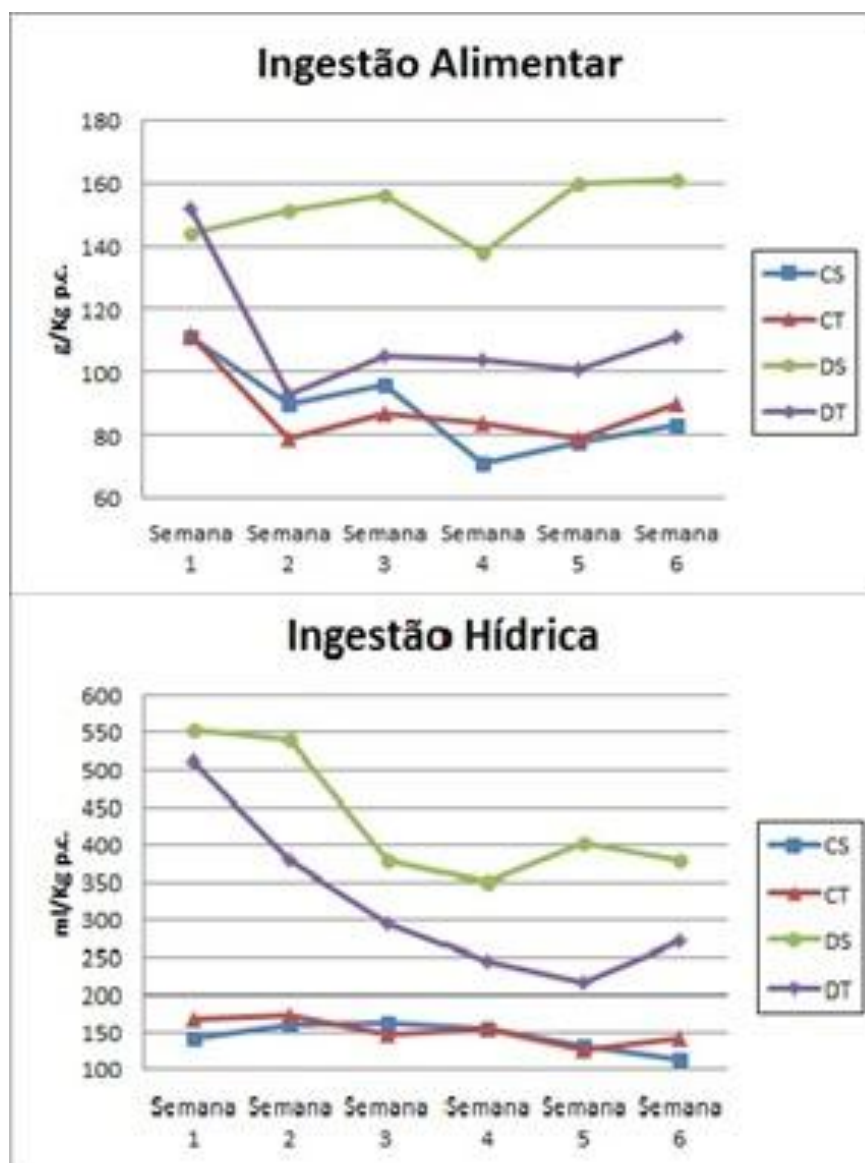


Figura 2: ingestão alimentar (g/kg p.c.) e ingestão hídrica (ml/kg p.c.) dos animais dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). Não há média padrão, pois as pesagens foram realizadas por gaiola.

A tabela 3 e figura 2 mostram a ingestão alimentar (g/kg p.c.) e ingestão hídrica (ml/kg p.c.) dos animais dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). Não é possível identificar diferença estatística, uma vez que as pesagens foram realizadas pelo consumo geral das gaiolas, e não pelo consumo individual de cada animal.

Tabela 4: Glicose (mg/%), Insulina (mUI/ml) e Hematócrito (%) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) com n=10. p<0,05: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Grupos	Glicose (mg/%)	Insulina (mUI/ml)	Hematócrito (%)
CS	102 \pm 10	8,8 \pm 1,8	48 \pm 2
CT	105 \pm 9	9,6 \pm 2,5	50 \pm 2
DS	325 \pm 12 a,b	4,9 \pm 2,1 a,b	49 \pm 2
DT	300 \pm 13 a,b,c	4,7 \pm 1,5 a,b	50 \pm 2

Na Tabela 4, em relação à glicose é possível identificar um aumento significativo no grupo DS em comparação aos grupos controle. Nota-se, também, uma diferença significativa entre o grupo DT e os demais. Quanto à insulina os grupos diabéticos apresentam uma diminuição significativa em relação aos grupos controle. Não há diferença significativa no hematócrito entre os grupos CS, CT, DS ou DT.

Tabela 5: Hormônio do crescimento (GH) no soro (ng/ml) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) após 6 semanas de experimento (n=10). p<0,05: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Grupos	Média
GH (ng/ml)	CS	3,21 \pm 0,43
	CT	3,27 \pm 0,36
	DS	2,7 \pm 0,26a,b
	DT	2,7 \pm 0,28a,b

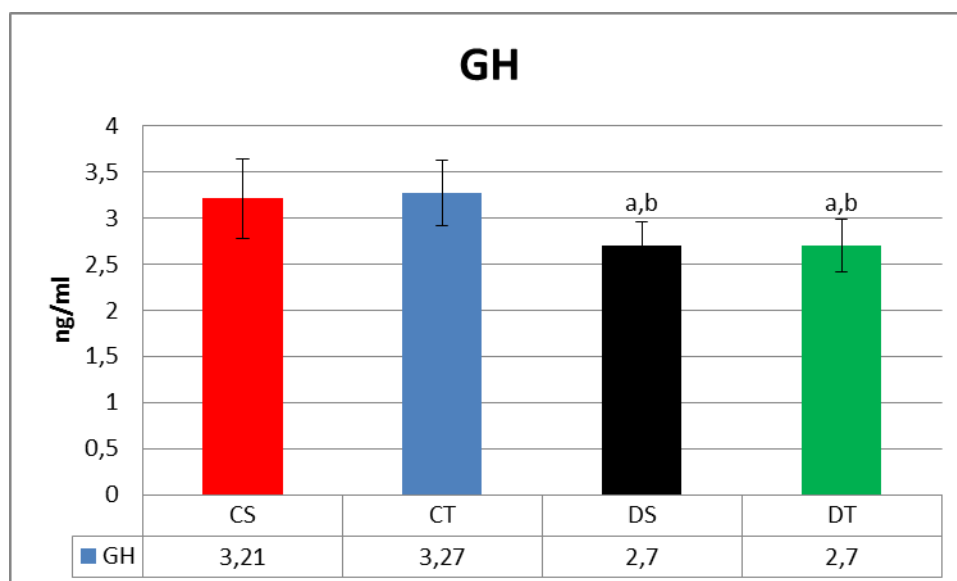


Figura 4: Hormônio do crescimento (GH) no soro (ng/ml) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) após 6 semanas de experimento. $p < 0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 5 e figura 4 é possível notar uma diminuição significativa do GH nos grupos diabéticos em comparação aos grupos saudáveis.

Tabela 6: Fator de Crescimento semelhante a Insulina (IGF-1) sérico dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) com $n=8$. $p < 0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Grupos	IGF-1 (ng/ml)
CS	88,4 \pm 9,3
CT	90,2 \pm 11
DS	55,1 \pm 14,8 a,b
DT	79 \pm 13,5

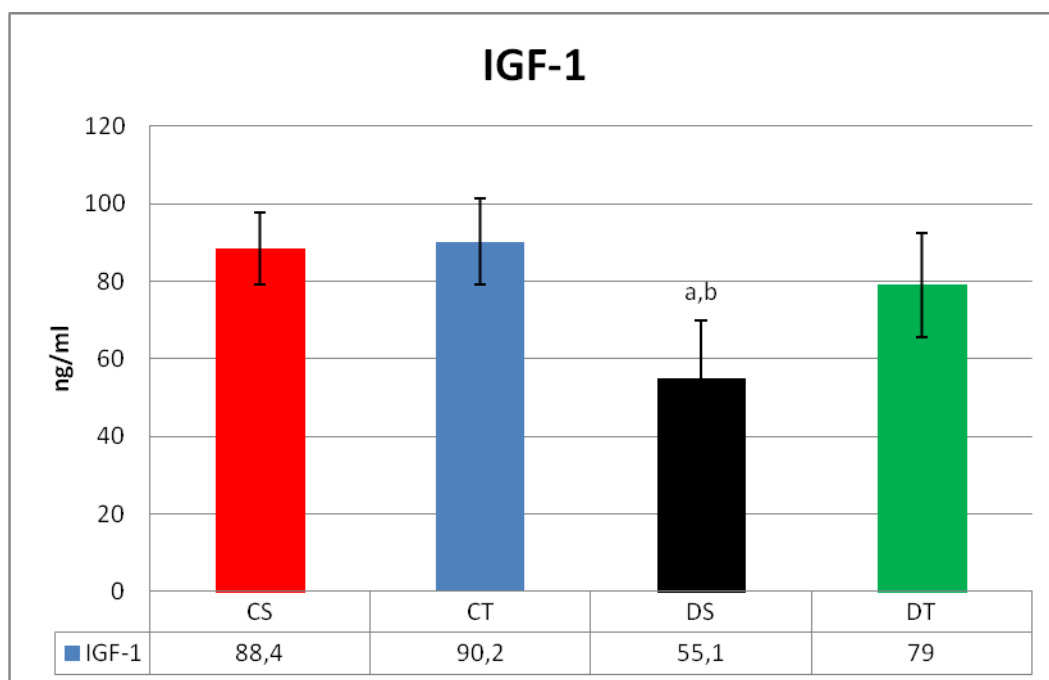


Figura 5: Fator de Crescimento semelhante a Insulina (IGF-1) sérico dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). $p < 0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão

Na tabela 6 e figura 5 nota-se uma redução significativa do IGF-1 sérico no grupo DS em comparação aos grupos saudáveis. Importante ressaltar que o grupo DT não apresentou diferença significativa com nenhum outro grupo.

Tabela 7: Lactato (mmol/L) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) com $n=8$. $p < 0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Grupos	mmol/L
Lactato	CS	$8,8 \pm 0,3$ b,d
	CT	$5,5 \pm 1,8$
	DS	$8,2 \pm 1,6$ b,d
	DT	$5,3 \pm 1,2$

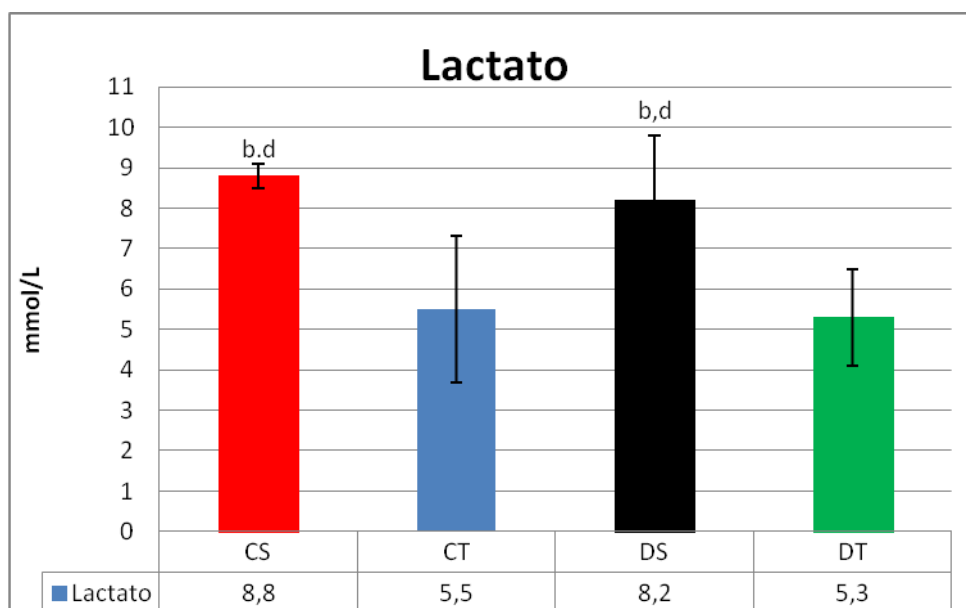


Figura 6: Lactato (mmol/L) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) em teste agudo de 20 minutos, realizado na ultima semana de experimento. $p < 0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 7 e figura 6 nota-se um aumento significativo no lactado dos grupos sedentários (CS e DS) em comparação aos grupos treinados (CT e DT). Importante ressaltar que estes foram os resultados da avaliação pós-treinamento (ultima semana de experimento).

Tabela 8: Carga média (% peso corporal) e Lactacidemia (mM) atingidas nos testes de lactato mínimo dos grupos controle treinado (CT) e diabético treinado (DT).

Grupos	Carga média (%)	Lactacidemia (mM)
CT	4,4 \pm 0,47	6,13 \pm 1,51
DT	4,25 \pm 0,53	6,24 \pm 1,1

Na tabela 8 é possível identificar as cargas médias dos animais treinados (resultantes dos testes de lactato mínimo) assim como a lactacidemia dos mesmos grupos.

Tabela 9: Latência (s) durante o Teste do Labirinto Aquático de Morris dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário

(DS) e diabético treinado (DT) com $n=8$. $p<0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT; #. diferente do resultado obtido no primeiro dia de teste. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Grupos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Teste de Labirinto aquático (s)	CS	$33 \pm 13,6$	$13 \pm 8,5\#$	$15,7 \pm 13,3$	$9,22 \pm 7,4\#$
	CT	$38,5 \pm 13,4$	$17,9 \pm 7,33\#$	$11 \pm 8,1\#$	$7,2 \pm 1,2\#$
	DS	$30,3 \pm 21,9$	$30,1 \pm 13,4a,b$	$20,5 \pm 9,6$	$10,1 \pm 7,1\#$
	DT	$32,5 \pm 17,7$	$29,2 \pm 19a,b$	$16 \pm 9,9\#$	$7,5 \pm 5,4\#$

Na tabela 9 é possível notar que os animais diabéticos apresentaram um deficit significativo no segundo dia de treinamento no labirinto de Morris em comparação aos grupos saudáveis. Também é possível observar que o grupo DS apresentou diferença significativa em comparação ao primeiro dia de teste apenas no ultimo enquanto os demais grupos já apresentaram diferenças no segundo (CT e CS) e terceiro (DT) dias.

Tabela 10: Tempo de retenção (s) durante o Teste do Labirinto Aquático de Morris dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) no quinto dia ($n=8$). $p<0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Grupos	Teste de retenção
Teste de Labirinto aquático – Dia 5 (s)	CS	$14,5 \pm 3,2$
	CT	$18,43 \pm 2,73$
	DS	$10,45 \pm 1,05a,b,d$
	DT	$15,21 \pm 1,08b$

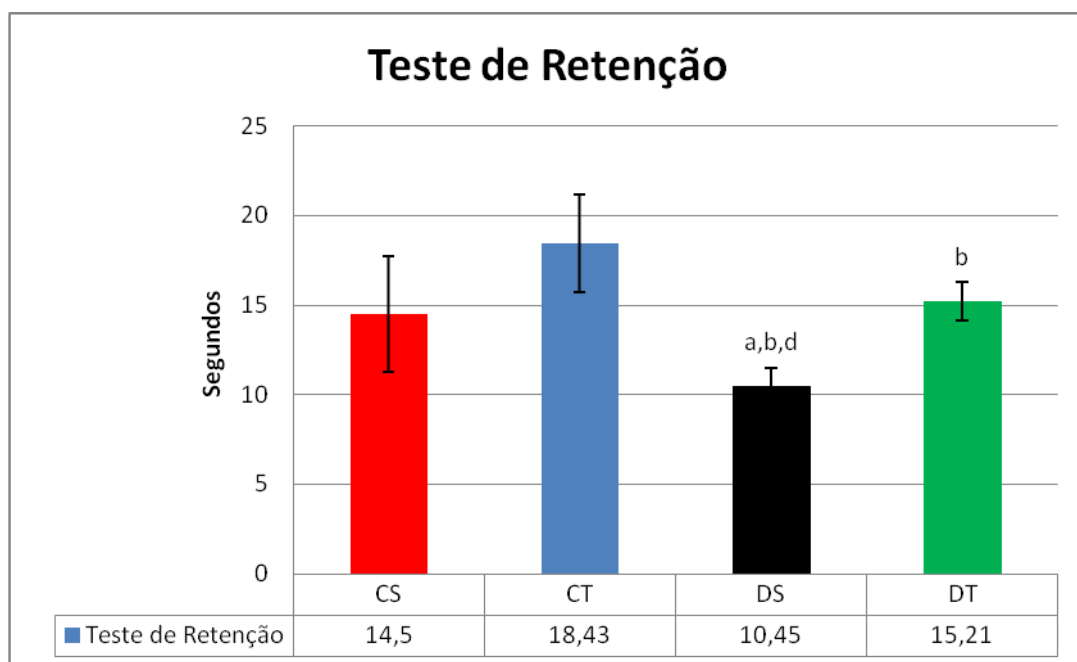


Figura 8: Tempo de retenção (s) durante o Teste do Labirinto Aquático dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) no quinto dia. $p < 0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 10 e figura 8 é possível notar uma redução significativa no tempo de retenção do grupo DS em comparação aos demais. O grupo DT também apresentou diferença significativa quando comparado ao CT.

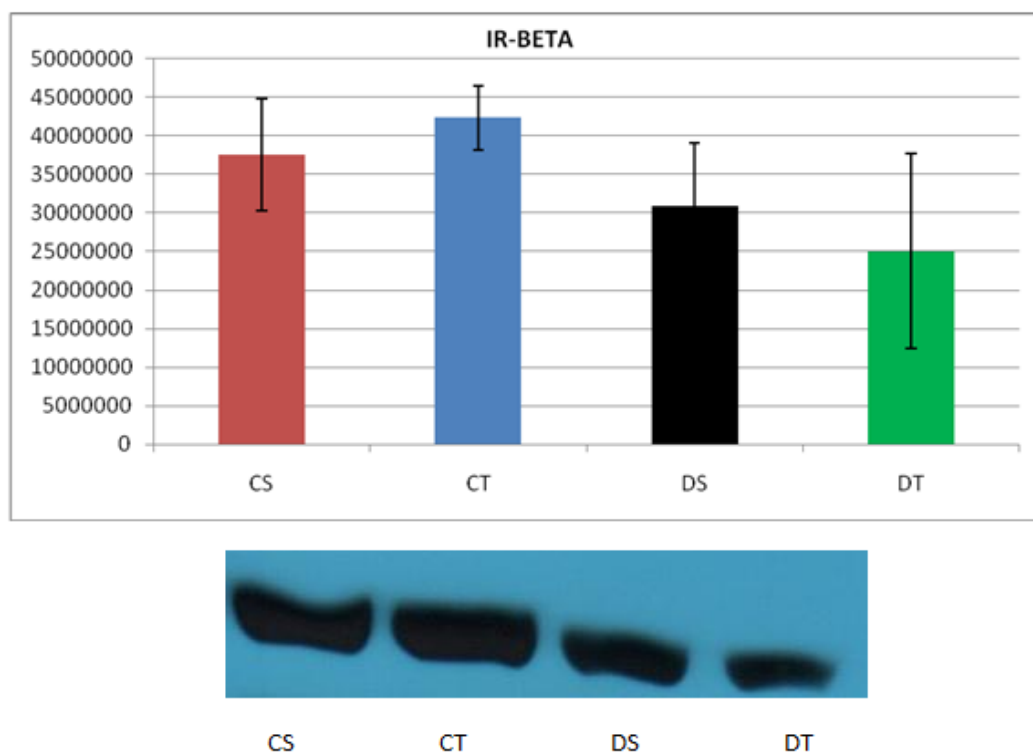


Figura 9: Expressão Receptor de insulina- β (Unidades Arbitrárias) do hipocampo (IR-Beta) dos ratos dos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) no quinto dia ($n=3$). $p<0,05$: a. diferente de CS; b. diferente de CT; c. diferente de DS; d. diferente de DT. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Na figura 9 nota-se que não há diferença significativa entre os grupos quanto à expressão do receptor de insulina no hipocampo.

4 - DISCUSSÃO

O exercício físico tem a capacidade de auxiliar na regulação do metabolismo dos carboidratos, atuando positivamente desta forma sobre o controle do DM. No presente estudo, foi investigado o efeito do treinamento físico aeróbio sobre parâmetros referentes ao metabolismo, funções endócrinas e memória espacial de ratos diabéticos aloxânicos.

Animais diabéticos cujas células beta do Pâncreas foram parcialmente destruídas pela Aloxana apresentam quadros clínicos de hiperglicemia, hipoinsulinemia, hiperfagia, polidipsia e menor ganho de peso. Quando a secreção de insulina é interrompida pela destruição de tais células, distúrbios metabólicos começam a se tornar evidentes, principalmente em animais sedentários (GUYTON e HALL, 1996). Os resultados encontrados no presente estudo em relação à insulimemia, glicemia, ingestão alimentar e hídrica e evolução de peso corporal (ver tabela 2) confirmam o estado clínico gerado pelo DM.

Na presente pesquisa os animais foram submetidos ao teste agudo de natação para avaliação da lactacidemia e nos grupos treinados (CT e DT) as concentrações foram significativamente inferiores aos grupos sedentários, mostrando a efetividade do protocolo de treinamento utilizado. O lactato é um metabólito produzido pelo músculo esquelético durante o exercício físico de alta intensidade, principalmente. Conforme a intensidade de trabalho aumenta, a concentração desse metabólito também se eleva, tornando este uma das principais medidas para avaliar a intensidade relativa de esforço (McARDLE, KATCH e KATCH, 2002).

Durante o treinamento físico (mesmo que de intensidade moderada) algumas alterações fisiológicas ocorrem que explicam as baixas concentrações ou a menor elevação de lactato:

- Aumento do número de capilares na musculatura esquelética, elevando o aporte sanguíneo e, conseqüentemente, diminuindo a necessidade de geração de energia pela via anaeróbia (McARDLE, KATCH e KATCH, 2002).

- Aumento das concentrações e eficiência de enzimas e agentes da via aeróbia (McARLDLE, KATCH e KATCH, 2002).

Tendo essas considerações em vista, o protocolo de treinamento usado na presente investigação foi eficiente em produzir alterações fisiológicas nos animais treinados.

No presente trabalho, o protocolo de exercício físico não proporcionou melhora significativa na ingestão alimentar e hídrica ou na insulinemia, mas foi capaz de redução significativa da glicemia no grupo DT em relação ao DS. É sabido que o exercício promove alterações periféricas, aumentando a captação de glicose, dentre estas estão o aumento da sensibilidade à insulina e a ativação da via de captação independente do hormônio (HORST *et al.*, 2002). No mesmo trabalho os autores observaram que o exercício físico tem a capacidade de aumentar a atividade tirosina-quinase dos receptores de insulina, aumentar a fosforilação dos substratos do receptor (IRS-1 e 2) e de sua associação a PI3-quinase e, conseqüentemente, aumentar a translocação de GLUT-4 no músculo esquelético de ratos diabéticos.

Na presente pesquisa, uma vez que os efeitos da última sessão de treinamento foram excluídos (48h repouso), o protocolo de exercício físico foi capaz de reduzir de maneira significativa a glicemia de ratos diabéticos, e, tendo em vista que a concentração sérica de insulina não sofreu alteração, e possivelmente o treinamento aumentou a sensibilidade periférica deste hormônio, ressaltando a eficácia do protocolo.

Organismos diabéticos podem apresentar quadros de desidratação, alterando assim os resultados de glicemia e outros fatores. Tal fenômeno ocorre basicamente por dois motivos:

- ⤴ A transferência osmótica de líquidos para fora da célula, que ocorre devido a incapacidade da glicose de se difundir dos poros das membranas celulares (GUYTON & HALL, 1996);
- ⤴ A excreção elevada de água pela urina, estimulada pela hiperglicemia (GUYTON & HALL, 1996). Estes fatores poderiam alterar os parâmetros avaliados neste estudo, contudo, tais alterações não foram encontradas, uma vez que não houve diferenças significativas no hematócrito dos grupos avaliados.

Em relação ao GH, sem a expressão deste hormônio o organismo não consegue se desenvolver de maneira adequada, e, somado à ausência da insulina, esta redução no

crescimento torna-se severa. Em organismos saudáveis o GH estimula a síntese proteica e a entrada de aminoácidos nas células (dentre outras funções). A insulina por sua vez, também favorece a captação de aminoácidos e a síntese proteica, e, desta forma, a redução de GH e insulina potencializa prejuízos na função e metabolismo celular. (GUYTON & HALL, 1996). Em estudo anterior foi demonstrada uma redução nos valores séricos de GH em ratos com DM tipo I (YANG *et al.*, 1990). No presente estudo, esta informação foi confirmada pela redução significativa das concentrações de GH nos grupos diabéticos quando comparados aos grupos saudáveis, explicando a menor evolução de peso do grupo DS. As hipóteses para essa redução incluem:

- Prejuízo na síntese de GH relacionado com os hormônios tireoidianos (ORTIZ-CARO *et al.*, 1984);
- Hiperglicemia (DAVIES *et al.*, 1984);
- Alça inibitória do IGF-1 sobre a síntese de GH (BERELOWITS *et al.*, 1981).
- Altos níveis de somatostatina que são frequentemente encontrados em ratos diabéticos (TANNENBAUM, 1981);
- Redução da insulinemia (GUYTON e HALL, 1996);

Estudos têm demonstrado que exercícios de curta duração e alta intensidade parecem estar mais bem relacionados à secreção de hormônios anabólicos (STOKES, 2003). A presente investigação corrobora com outros estudos, que não demonstraram aumento das concentrações de GH em animais diabéticos submetidos ao treinamento aeróbio (LUCIANO e MELLO, 1998; GOMES *et al.*, 2003).

Em relação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1), sua concentração sérica encontra-se reduzida em organismos diabéticos, já que seu principal estímulo para produção hepática é o GH (HOLT, 2002). Em pesquisa anterior foi mostrado que a secreção de IGF-1 pode ocorrer também de maneira independente do Hormônio do Crescimento e que o exercício físico pode ajudar nesse estímulo (BORST *et al.*, 2001). Na presente investigação, os animais diabéticos apresentaram menor concentração sérica de IGF-1 que os saudáveis. Apesar do protocolo de treinamento não elevar os valores séricos de IGF-1 no grupo DT em relação ao DS, pode-se dizer que o exercício físico atenuou essa redução, uma vez que também não há diferenças significativas entre DT e os grupos controles. Importante ressaltar que este pode ser um

dos motivos da manutenção do peso, mesmo que parcial, dos animais do grupo DT em comparação ao grupo DS.

Em pesquisa anterior (YAKAR *et al.*, 2002) foi mostrado que o IGF-1, além de sua função endócrina, sendo secretado pelo fígado, também possui funções parácrina (atuando em células vizinhas) e autócrina (agindo sobre a própria célula secretora). É possível que os valores encontrados no presente estudo referentes à concentração plasmática deste polipeptídeo no grupo DT resultem da capacidade do exercício físico de estimular sua produção local, por exemplo, na musculatura esquelética, ou ainda por estimulação hepática independente de GH (HORST *et al.*, 2002).

Quanto ao Teste de Morris, este é aplicado para avaliar a memória espacial e a capacidade de aprendizado nos animais estudados. Na pesquisa de HENG *et al.* (2011) durante os testes, os animais diabéticos demoraram mais para achar a plataforma que os animais controle. No mesmo estudo, durante o teste em que a plataforma foi retirada, passaram menos tempo no quadrante onde a mesma deveria estar, mostrando uma redução significativa na memória e aprendizado do grupo diabético quando comparado ao grupo controle. No presente estudo esta informação foi confirmada, porém o exercício teve a capacidade de elevar o tempo de retenção do grupo DT (no teste em que a plataforma foi retirada) ao ponto que não houve diferença significativa deste em comparação ao grupo controle.

O presente estudo corrobora com trabalhos anteriores (PRAAG *et al.*, 2005; ALAEI *et al.*, 2007) que utilizaram o teste de labirinto aquático de Morris para avaliar o efeito do exercício físico sobre a memória espacial de camundongos e ratos respectivamente. Esses autores evidenciaram que os animais treinados apresentaram uma elevação significativa no tempo de retenção em comparação com os animais controle. Na presente pesquisa os animais diabéticos treinados mostraram melhora no tempo de retenção, não havendo diferença entre estes e os animais saudáveis. Este trabalho também evidenciou que o grupo DS apenas apresentou diferença entre o primeiro dia de teste de latência no último dia, enquanto os demais grupos apresentaram diferença no segundo (CT e CS) e terceiro (DT) dias, mostrando uma redução da memória dos animais diabéticos sedentários.

Sabe-se que a função alterada da insulina e da sinalização do IGF-1, assim como a hiperglicemia tem sido apontadas como agentes contribuintes em complicações cognitivas e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (HOYER, 2004; LIN *et al.*, 2001; CARRO, 2004), sugerindo que DM e Alzheimer

compartilham causas semelhantes no seu surgimento. BAKER *et al.* (2010) apontam que a melhora na sensibilidade da insulina, aumento de aporte sanguíneo cerebral e outros parâmetros metabólicos induzidos pelo exercício podem gerar benefícios para a cognição.

Assim sendo, os dados da presente pesquisa realizada com seis semanas de treinamento aeróbio confirmam o que foi investigado por um estudo anterior que utilizou oito semanas de treinamento (GOMES *et al.*, 2009). Ambos os estudos observaram prejuízos no peso corporal, glicemia e no eixo GH/IGF-1 em animais diabéticos sedentários. Além disso, nos dois estudos (treinamento de oito e seis semanas) houve recuperação parcial apenas da glicemia, peso corporal e concentrações séricas de IGF-1.

É importante destacar que a presente investigação avaliou também a expressão do receptor de insulina (IR- β) no hipocampo dos animais. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Li *et al.* (2007) observaram redução significativa do IR- β no córtex frontal de ratos diabéticos tipo I. Outros estudos observaram prejuízo na sinalização insulínica (IR- β) no hipocampo de ratos diabéticos (Li *et al.*, 2005; Sima *et al.*, 2004). É possível que tais alterações não tenham sido evidenciadas no presente trabalho em função do reduzido número de animais para este parâmetro (n=3).

Apesar de algumas limitações do trabalho, é possível inferir que o diabetes prejudicou aspectos relacionados ao eixo GH/IGF-1 e a memória espacial, enquanto que o treinamento físico de natação recuperou alguns desses aspectos. Estudos adicionais envolvendo a via de sinalização da insulina e do IGF-1 no cérebro de ratos diabéticos sedentários e treinados são necessários para a melhor compreensão da relação entre diabetes e alterações cognitivas.

5 - CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o Diabetes mellitus tipo I prejudicou aspectos endócrino-metabólicos dos animais sedentários. Além disso, o eixo GH/IGF-1 também foi prejudicado pela doença e possivelmente resultou na redução da memória espacial, observada no teste de retenção.

O exercício físico melhorou o ganho de peso, reduziu a hiperglicemia e o lactato durante o teste agudo, mostrando assim a eficiência do protocolo sobre parâmetros metabólicos dos animais diabéticos. O treinamento foi capaz de elevar os valores séricos de IGF-1, apesar de não ter recuperado as concentrações de GH nos animais aloxânicos.

O tempo de retenção no teste de labirinto aquático foi recuperado pelo exercício físico no grupo DT, evidenciando uma melhora significativa na memória espacial dos ratos treinados.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- ASTUR, R. S. *et al.* Humans with hippocampus damage display severe spatial memory in a virtual Morris water task. **Behavioral Brain Research**, n.132, p.77-84, 2002.
- ALAEI, H. *et al.* Daily running promotes spatial learning and memory in rats. **Journal of Sports Science and Medicine**, n.6, p.429-433, 2007.
- BAKER, D. L. *et al.* Aerobic exercise improves cognition for older adults with glucose intolerance, a risk factor for Alzheimer's disease. **J. Alzheimer Dis.**, n.22, v 2, p.569-579, 2010.
- BERELOWITZ, M. *et al.* Somatomedin C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and pituitary. **Science**, Washington, v.212, p.1279-1281, 1981.
- BINGHAM, E. M. *et al.* The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. **Diabetes**, 2002.
- BRUNING, J. C. *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, 2000.
- BORST, S. E. *et al.* Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF-1 binding proteins. **Medicine and Science in Sports and Exercise** v.33, n.4, p.648-653, 2001.
- BUTLER, A. A., LEROITH, D. Control of Growth by the somatotropic Axis: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles. **Annu. Rev. Physiol**, v.63, p.141-164, 2001.
- CARRO E. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. **Eur. Journal of Pharmacol**, p.127-133, 2004.
- COOPER, D. L. Evidence for and mechanisms of exercise modulation of growth: an overview. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 26, p. 733-740, 1994.
- DAVIES, R.R.; TURNER, S.; JOHNSTON, D.G. Oral glucose inhibits growth hormone secretion induced by human pancreatic growth hormone releasing factor 1-44 in normal man. **Clinical Endocrinology**, v.21, p.447-481, 1984.

- DE ANGELIS K. *et al.* Diabetes e exercício físico. In: NEGRÃO C.E., BARRETO A.C.P. **Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata**. 3.ed.Revisada e Ampliada. Barueri: Manole, 2010, p.470-517.
- DUBOIS M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 1956.
- GOMES R.J. *et al.* Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. **Growth Hormone & IGF Research.**, 2006.
- GOMES R.J. *et al.* Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. **Hippocampus**, 2009.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996, p.291-386, 883-894.
- HOLT, R.I. Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism**, v.13, n.9, p.392-397, 2002.
- HOYER, S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **Eur J Pharmacol**, p.115–125, 2004.
- JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin- Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 03-34, 1995.
- LI, Z. G., ZHANG, W., SIMA, A. A. F. The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy. **Brain Res**, p.12–24, 2005.
- LIN, B., GINSBERG, M. D., BUSTO R. Hyperglycemic but not normoglycemic global ischemia induces marked early intraneuronal expression of β -amyloid precursor protein. **Brain Res**, p.107–116, 2001
- LUCIANO E. *et al.* Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol.**, v.147, p.149-57, 2002.
- LUCIANO, E., MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v.12, n.2, p.202-209, 1998.
- MCARDLE, W. D., KATCH, F. I., KATCH, V. L. **Fundamentos de fisiologia do exercício**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002, p.122-139.
- MOLONEY A.M. *et al.* Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signaling. **Neurobiol Aging**, p.224-243, 2010.

- MONTEIRO N. *et al.* Efeitos de um programa de atividade física regular sobre os níveis séricos basais de IGF-1 em idosos. **Fitness & Performance Journal**, v.3, n.3, p. 130-135, 2004.
- MORRIS R.G.M., GARRUD P.; RAWLINS J.N.P., O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, p.681-683, 1982.
- ORTIZ-CARO, J. *et al.* Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food- restricted rats. **Endocrinology**, Bethesda, v.115, p.2227-2232, 1984.
- PARK C.R. Cognitive effects of insulin in the CNS. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, p.311–323, 2001.
- REISI P. *et al.*, Treadmill running improves long-term potentiation (LTP) defects in streptozotocin-induced diabetes at dentate gyrus in rats. **Pathophysiology**, p.33-38. Epub 2009 Jul 30, 2010.
- RORIZ-FILHO J. *et al.* (Pre)diabetes, brain aging and cognition. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.432-443, 2009.
- SHARMA S., RAKOCZY Y., BROWN-BORG H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences**, n.87, p.521-536, 2010.
- SCHWARTZ M.W. Staying slim with insulin in mind. **Science**, 289:2066–2067 2000.
- SIMA A. A. F, KAMYIA H., LI Z. G. Insulin, C-peptide hyperglycemia and central nervous system complications in diabetes. **Eur J Pharmacol**, p.187–197, 2004.
- TANNENBAUM G.S. Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: Evidence of a role endogenous circulating somatostatin. **Endocrinology**, v.108, p.76-82, 1981.
- WOODS S.C. *et al.* Food intake and the regulation of body weight. **Annu. Rev. Psychol.**, n.51, p.255-277, 2000.
- VOLTARELLI F.A. *et al.* Metabolic transition and lactate minimum test in rats: new proposal of effort quantification. **R. da Educação Física**, v.16, n.1, p.73-78, 2005.
- WESSELS A.M. *et al.* Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type I diabetes. **European Journal of Pharmacology**, n.585, p.88-96, 2008.
- YAKAR, S. *et al.* Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. **J. Clin. Invest.**, v.110, p.771-81, 2002.
- YANG, H., SCHEFF, A.J., SCHALCH, D.S. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus on Growth and Hepatic Insulin-Like Growth Factor I Gene Expression in the rat. **Metabolism**, v.39, p.295-301, 1990.

YOU, J.S. *et al.* Long-term treadmill exercise-induced neuroplasticity and associated memory recovery of streptozotocin-induced diabetic rats: an experimenter blind, randomized controlled study. **NeuroRehabilitation**, p.291-297, 2009.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo



UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1959

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 22 de junho de 2012
CEP Nº: 0217/12

Ilmo(a) Sr(a)
Pesquisador(a): RICARDO JOSÉ GOMES
Disciplina/Departamento Educação Física
Pesquisadores associados: José Rodrigo Pauli, Eliete Luciano, Maria Alice Rostom de Mello, Ricardo José Gomes (orientador)

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina e do IGF-1 no cérebro de ratos diabéticos :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Investigar os efeitos do treinamento físico moderado e do exercício físico agudo sobre a memória espacial, bem como sobre algumas proteínas envolvidas nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina e do IGF-1 no hipocampo e cerebelo de ratos diabéticos aloxânicos.

RESUMO: Estudo com 60 ratos Wistar, machos, com 90 dias. Anestésico: tiopental. Eutanásia: anestesia seguida de decapitação. Será injetada aloxana para indução de DM1. Os ratos serão distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: Controle sedentário (CS); controle treinado (CT); diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). O protocolo de treinamento consistirá de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 6 semanas consecutivas, suportando sobrecarga equivalente à 90% da máxima fase estável do lactato individual. Após o sacrifício dos animais, amostras de sangue serão coletadas para determinação das concentrações de glicose, insulina, GH e IGF-1. Amostras do hipocampo e cerebelo serão extraídas para a determinação da expressão e atividade de proteínas envolvidas nas etapas iniciais da sinalização da insulina e do IGF-1 (IR, IGF-1R, IRS-1, IRS-2, PI3-q, Akt, ERK1/2, GSK-3-β), bem como para avaliação de proteínas relacionadas com a degeneração cerebral (proteína tau, APP e proteína β-Amiloide). Tais análises serão realizadas por imunoprecipitação e imunoblot

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O Diabetes Mellitus é uma doença crônica que tem sido associada com prejuízos na memória, alterações neurológicas e com a Doença de Alzheimer (AD). Alguns estudos apontam para a importância da realização do exercício físico para prevenir e minimizar diversas alterações neurológicas. Acredita-se que os efeitos positivos do exercício físico sobre a função cerebral sejam mediados pela insulina e pelo IGF-1. Contudo, poucos são os estudos que investigam os efeitos do treinamento físico sobre as etapas da via de sinalização da insulina e do IGF-1 no hipocampo de animais diabéticos. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo investigar os efeitos do treinamento físico moderado sobre algumas proteínas da via de sinalização da insulina e do IGF-1 no hipocampo e cerebelo de ratos diabéticos experimentais.

MATERIAL E MÉTODO: Estudo aprovado pelo Núcleo de Bioética da Baixada Santista nº 017/12. Estão descritos os procedimentos do estudo.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 450,00

CRONOGRAMA DO ESTUDO: Adequado

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 17/06/2013 e 12/06/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Página 1 de 2

Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil

CEP N 0217/12



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo